

# Rola metylacji DNA w etiopatogenezie chorób układu krążenia

The role of DNA methylation in etiopathology of coronary heart diseases

Beata Kieć-Wilk

Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Kardiologia Pol 2010; 68: 202-207

## Wstęp

W ciągu kilkudziesięciu ostatnich lat dzięki postępowi technicznemu i rozwojowi metod biologii molekularnej bardzo rozwinęła się wiedza dotycząca dziedzicznego uwarunkowania chorób. Coraz częściej w praktyce klinicznej kładzie się nacisk na rozpoznanie uwarunkowania dziedzicznego chorób cywilizacyjnych, takich jak: otyłość, cukrzyca, nadciśnienie czy choroba niedokrwienna serca [1, 2]. Obserwacje te i badania potwierdziły, iż dziedzicznie wielogenowe, czyli równocześnie występujące mutacje lub polimorfizmy (zamiana zasad w sekwencji DNA) kilku genów, zwiększa predyspozycję do rozwoju danego schorzenia [3, 4]. Rozwój wiedzy na temat dziedziczenia zwrócił równocześnie uwagę na tzw. pozagenowe dziedziczenie predyspozycji do rozwoju chorób, którego badaniem zajmuje się epigenetyka [5, 6]. Termin „epigenetyka” został zaproponowany przez C.H. Waddingtona w opisie mechanizmów różnicowania się tkanek w rozwoju organizmów. Epigenetyka zajmuje się badaniem i opisem mechanizmów polegających na powstaniu cech dziedziczonych przez komórki potomne, ale które nie są związane z polimorfizmem lub mutacjami samego DNA. Przykładami procesów epigenetycznych w tym rozumieniu są m.in. stabilne zmiany ekspresji genów w rozwoju tkanki (lub ontogenezie) poprzez mechanizm zahamowania transkrypcji i inaktywacja (wyciszenie) jednej z kopii chromosomu X u samic ssaków [6, 7]. Inną gałęzią badań w epigenetyce jest badanie dziedziczności pozagenowej, w szczególności cech, które nie są determinowane sekwencją jądrowego DNA. Przykładem tego rodzaju procesów epigenetycznych jest np. zjawisko dziedziczenia związane z obecnością prionów u drożdży, kontrola procesu transpozycji transpozonów i retrotranspozonów poprzez metylację DNA [8]. Niektórzy

badacze zaliczają również dziedziczenie mitochondrialne (mające własną nić DNA) do zjawisk epigenetycznych, ze względu na dziedziczenie cech niezgodne z prawami Mendla i zależne nie tylko od ekspresji genów jądrowego DNA. Nie jest to pogląd szczególnie poprawny [9].

## Mechanizmy epigenetyczne

Mechanizmy leżące u podstaw procesów epigenetycznych są zróżnicowane, nie do końca poznane i należą do najbardziej interesujących problemów badawczych współczesnej biologii molekularnej. Dotyczą bowiem poznania mechanizmów różnicowania się tkanek w okresie embrionalnym i bezpośredniego wpływu środowiska na modyfikację ekspresji genów [5].

Stabilne i dziedziczne wyciszenie ekspresji genów ma związek z chemicznymi modyfikacjami białek histonowych i samego DNA (np. metylacja DNA) [10, 11] (Rycina 1).

### Posttranslacyjna modyfikacja histonów

Materiał genetyczny organizmów, w tym człowieka, zawarty jest w postaci dwuniciowego DNA, które *in vivo* występuje w formie skondensowanej chromatyny. W skład nukleosomów wchodzi fragmenty DNA nawiniętego dookoła rdzenia białkowego zbudowanego z zasadowych białek histonowych: H2A, H2B, H3 i H4 [12, 13]. Histony są białkami o niewielkiej masie cząsteczkowej (poniżej 23 kDa) i występują u wszystkich organizmów eukariotycznych. Histony H3 i H4 są najbardziej konserwatywne ewolucyjnie, natomiast histon H1, zwany czasem histonem łącznikowym, gdyż spina DNA wchodzące i schodzące z nukleosomu, jest najbardziej zmienny [13].

Modyfikacja obydwu składników chromatyny – nici DNA (metylacja) i białek histonowych (jak acetylacja, mety-

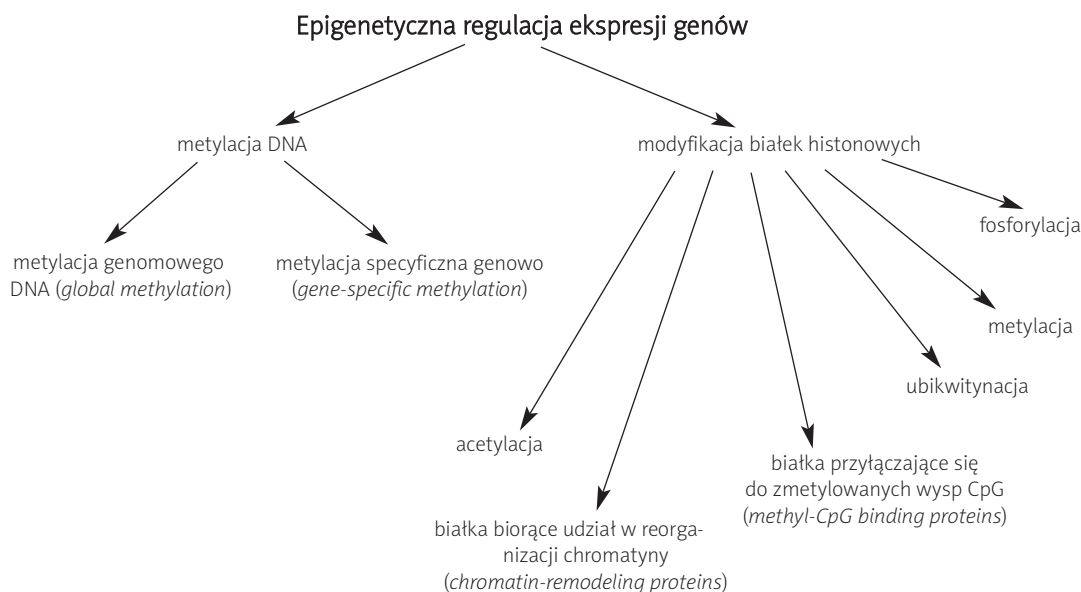
---

## Adres do korespondencji:

dr n. med. Beata Kieć-Wilk, Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Kopernika 15a, 31-501 Kraków, tel.: +48 12 421 87 92, e-mail: mbbkiec@cyf-kr.edu.pl

Praca wpłynęła: 30.06.2009. Zaakceptowana do druku: 01.07.2009.

Praca powstała w ramach realizacji projektu Ministerstwa Nauki i Informatyzacji (MNiI) nr N401 008 31/0143 (0143/P01/2006/31).



**Rycina 1.** Epigenetyczne mechanizmy regulacji ekspresji genów

lacja czy ubikwitynacja) – wpływa na przylaczanie się układu białek odpowiedzialnych za transkrypcję, a przez to wpływających na ekspresję genów [5, 11, 14]. Dodatkowo modyfikacje takie stanowią sygnał dla białek odpowiedzialnych za przebudowę chromatyny, co prowadzi do zwiększonej kondensacji (heterochromatynizacja) chromatyny i w tym mechanizmie – do zatrzymania ekspresji genów [7, 15, 16]. Przykładem tego procesu może być metylacja histonu H3 na dziewiątym aminokwasie (lizyna), która powoduje zmniejszenie ekspresji genów [16]. Równocześnie acetylacja białek histonowych, zachodząca najczęściej na histonie H4 i dotycząca lizyny, powoduje częściową dekondensację chromatyny, przez co jest ona bardziej dostępna dla czynników transkrypcyjnych i co wiąże się ze zwiększeniem poziomu ekspresji genów [16, 17]. Warto zauważyć, że wpływ modyfikacji posttranslacyjnych histonów na stopień kondensacji chromatyny i ekspresję genów nie zależy tylko od rodzaju modyfikacji (metylacja, acetylacja, fosforylacja itp.), ale także od miejsca wystąpienia takiej modyfikacji na białku histonowym [16]. Wydaje się również, że modyfikacja końcowych fragmentów histonów H3 i H4 wpływa na zdolność do przylaczania się do DNA enzymów odpowiedzialnych za metylację cytozyn w materiale genetycznym, tzw. metylotransferaz DNA, czy samych czynników transkrypcyjnych [18]. Należy pamiętać, że jedna cząsteczka histonu może być również modyfikowana w wielu miejscach, co dodatkowo utrudnia badanie tych procesów [10, 12, 15].

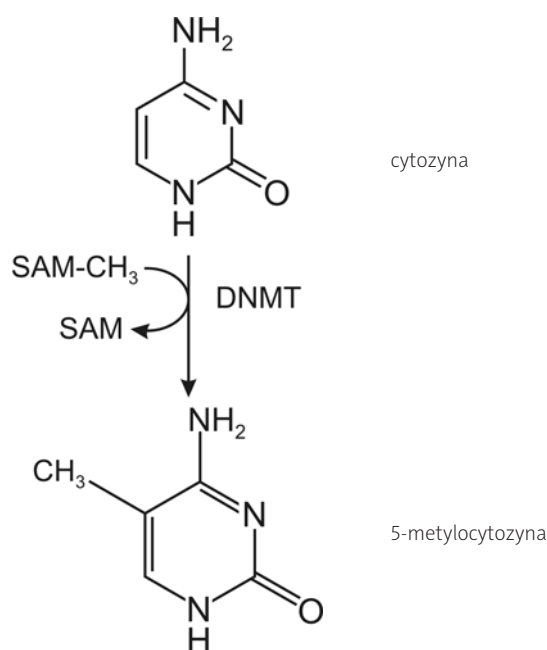
#### Hipoteza kodu histonowego

Na podstawie wyników dotychczasowych badań naukowcy wysunęli hipotezę istnienia tzw. „kodu histono-

wego”, rozumianego jako zespół reguł mówiących o roli konkretnych modyfikacji histonów w regulacji struktury chromatyny i ekspresji genów [16, 19]. Pomimo licznych obserwacji dotyczących posttranslacyjnych modyfikacji histonów i ich funkcji w dziedziczeniu epigenetycznym, dotychczas nie znaleziono uniwersalnego układu, który można by nazwać kodem histonowym. Wydaje się, że nie będzie to kod uniwersalny, czyli będzie różny dla różnych gatunków [19].

#### Metylacja cytozyny (metylacja DNA)

Metylacja DNA jest procesem kowalencyjnego przylaczania grup metylowych (-CH<sub>3</sub>) do zasad azotowych nukleotydów, w szczególności do cytozyny, rzadziej do adeniny (w pozycji 6.) wchodzących w skład nici DNA [20, 21]. Produktem metylacji cytozyny jest głównie 5-metylocytozyna. W proces przylaczania grup -CH<sub>3</sub> zaangażowane są enzymy z grupy metylaz DNA 1, 3a oraz 3b (ang. *DNA methyltransferases*; DNMT1, DNMT3a, DNMT3b), które katalizują reakcję przeniesienia grup metylowych z S-adenozynometoniny (SAM) na węgiel w pozycji 5. pierścienia cytozyny [22] (Rycina 2.). Uważa się, że DNMT3a i DNMT3b odpowiadają za metylację DNA *de novo* i tworzą wzór metylacji DNA we wczesnych etapach rozwoju organizmów [22]. DNMT1 natomiast przypisuje się funkcję podtrzymywania wzoru metylacji DNA podczas podziału komórek (replikacji) i wzrostu tkanek organizmu [22]. Znane jest również białko DNMT3L, które wykazuje homologiczną budowę z innymi metylotransferazami, ale nie ma aktywności enzymatycznej [22]. Obserwacje wykazały, iż rola DNMT3L w procesie tworzenia metylacji DNA *de novo* polega na promowaniu wiązania się metylotransferaz z nicią DNA i zwiększaniu ich aktywności [22].



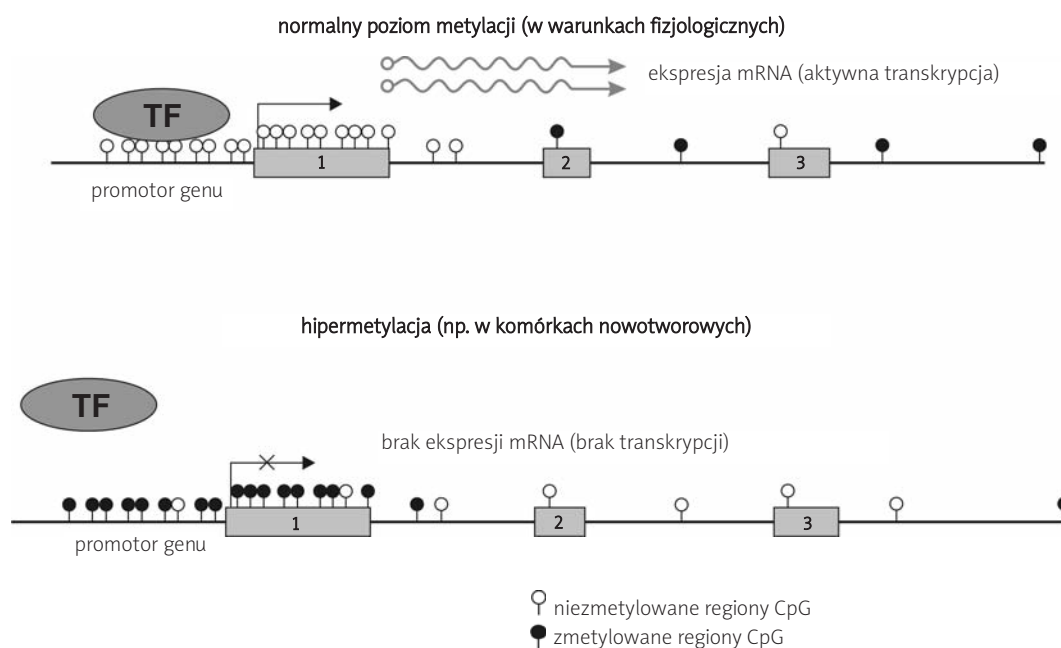
**Rycina 2.** Mechanizm metylacji DNA

Metylaza DNA (DNMT) to enzym katalizujący reakcję przeniesienia grup metylowych (-CH<sub>3</sub>) z SAM na węgiel w pozycji 5. pierścienia cytozyny, w wyniku czego powstaje 5-metylocytozyna.

U ssaków ok. 5% reszt cytotynowych jest stale zmetylowanych, metylacja zachodzi zazwyczaj w dinukleotydowych sekwencjach CpG, często nazywanych „wyspami CpG” (ang. *CpG islands*) [23]. W genomie ssaków wyspy

CpG stanowią odcinki o długości 300–3000 bp, znajdują się w obrębie lub w bliskim sąsiedztwie promotorów 40% genów u ssaków (u człowieka w ok. 70% promotorów) [11, 23]. Nie ma jednoznacznej definicji wysp CpG, zwyczajowo używa się terminu określającego wyspę CpG jako region zbudowany z co najmniej 200 bp, w którym procentowa zawartość nukleotydów cytozynowych (C) i guaninowych (G) jest większa niż 50% i w którym stosunek CpG stwierdzany do spodziewanego jest większy niż 60% [23]. Gdy gen ulega ekspresji, wyspy CpG w jego promotorze, w przeciwieństwie do regionów kodujących, nie są zmetylowane. Wzrost metylacji części regulatorowej genu może wywołać zahamowanie jego ekspresji; ogólnie zakłada się, że wysoka metylacja (hipermetylacja) pewnych fragmentów chromatyny związana jest z jej częściową lub całkowitą inaktywacją transkrypcyjną [23] (Rycina 3.). Duży odsetek zmetylowanych nukleotydów stanowi sygnał do inicjacji procesów kondensacji chromatyny, co jest równoznaczne z przemianą euchromatyny w niedostępną dla czynników transkrypcyjnych heterochromatynę [23]. Dalsze badania wykazały, że poziom ekspresji danego genu jest skorelowany z ilością zmetylowanego DNA w sekwencji promotora – im stopień metylacji jest większy, tym słabsza ekspresja danego genu [11].

Kodująca część cząsteczki DNA – 1,2,3-eksony (egzony), ulegając transkrypcji, pojawia się w dojrzałej cząsteczce RNA. Zawiera informacje o sekwencji aminokwasowej białka. Czynniki transkrypcyjne (ang. *transcription factor*, TF) to białko wiążące DNA na obszarze promotora, gdzie reguluje proces transkrypcji (proces syntezy RNA na matrycy DNA przez różne polimerazy RNA, czyli przepisywanie informacji zawartej w DNA na RNA).



**Rycina 3.** Metylacja DNA w mechanizmie wyciszenia genów (ang. *gene silencing*)

## Rola metylacji DNA w etiopatogenezie schorzeń

### Transformacja nowotworowa

Poprzez metylację DNA kontrolowane są istotne procesy związane z rozwojem organizmów, takie jak imprinting rodzicielski czy inaktywacja chromosomu X [11, 23]. Zaburzony profil metylacji regionów CpG stanowi częsty epigenetyczny mechanizm promujący karcynogenezę i jest jednym z głównych procesów transformacji nowotworowej komórek [24] (Rycina 4.). W komórkach nowotworowych, w których stwierdzano nadekspresję genów kodujących białka promujące wzrost i proliferację komórek, wykazano zmniejszony poziom metylacji (hipometylację) w obrębie promotorów tych genów [24]. Dodatkowo badania kliniczne i eksperymentalne wykazały, że obniżający się poziom metylacji genomowego DNA korelował z przejściem od łagodnej proliferacji komórek do inwazyjnego raka [24, 25]. Stwierdzono, że hipometylacja DNA powodowała zwiększoną liczbę mutacji (delecję, utratę całego chromosomu) związanych z rekombinacją mitotyczną [26]. Należy jednak pamiętać, iż pomimo obniżonego poziomu metylacji genomowego DNA (ang. *genome-wide DNA methylation* lub *global methylation*) w komórkach nowotworowych, istnieją regiony (głównie promotorowe) nasilonej metylacji DNA, tzw. metylacja specyficzna genowo (ang. *gene specific methylation*) [10, 21, 23]. W liniach komórek nowotworowych wykazano hipermetylację regionów promotorowych i zahamowanie ekspresji genów regulujących cykl komórkowy (np. białko p16) czy białek adhezyjnych (np. E-kadheryny) [27, 28].

### Angiogeneza

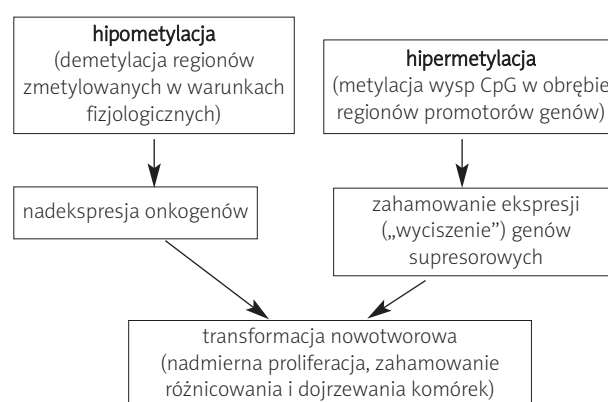
Angiogeneza to proces tworzenia nowych naczyń krwionośnych na bazie już istniejących, wyścielonych śródbłonkiem naczyń, poprzez ich rozgałęzianie (ang. *branching*), wypączkowanie, wydłużanie i przebudowę istniejącego światła naczynia [29]. Fizjologiczna angiogeneza występuje podczas przebudowy i wzrostu tkanek, natomiast nasilona, patologiczna angiogeneza towarzyszy wielu schorzeniom, np. nowotworowym (powstające naczynia krwionośne odżywiają guz i przyczyniają się do tworzenia przerzutów) i procesom immunologiczno-zapalnym – reumatoidalnemu zapaleniu stawów, blaszce miażdżycowej, cukrzycy i in. [29–32]. Angiogeneza podlega regulacji przez wiele czynników zarówno biochemicznych, jak i fizycznych, np. czynniki wzrostu – m.in. VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*), bFGF (ang. *basic fibroblast growth factor*), PDGF (ang. *platelet-derived growth factors*) czy TGF- $\alpha$  (ang. *transforming growth factor alpha*), TNF- $\alpha$  (ang. *tumor necrosis factor alpha*), interleukiny (IL-1, IL-8) produkowane przez komórki zapalne (makrofagi), pericyty, keratynocyty, jak również tlenek azotu (NO) (generowany przez syntazę tlenku azotu), angiopoetynę, endotelinę-1, oddziaływanie między komórkami (rola integrzyn), metaloproteinazy (MMP), indukowane przez hipoksję [29, 33–35].

Coraz większą uwagę poświęca się wpływowi elementów diety – nutrientów, na ekspresję tych genów, a przez to na regulację procesu angiogenego [36]. Wykazano np., że składniki diety wpływają na mechanizmy regulacji ekspresji genów, w tym na metylację DNA [21, 37].

### Choroba sercowo-naczyniowa (miażdżycy i remodeling naczyniowy)

Miażdżycę tętnic jest przewlekłą chorobą zapalną charakteryzującą się występowaniem zmian zwyrodnieniowo-wytwórczych w błonie wewnętrznej i środkowej tętnic, głównie w aorcie, tętnicach wieńcowych i mózgowych [38, 39]. Etiologia miażdżycy tętnic nie jest w pełni poznana. Do jej powstania i rozwoju usposabiają m.in. hipercholesterolemia, hiperhomocysteinemia, cukrzyca, nadciśnienie tętnicze, zaburzenia krzepnięcia krwi, ale także styl życia (błędy dietetyczne, stres, mała aktywność fizyczna) [38, 39]. U podłoża działania wszystkich czynników predysponujących do rozwoju miażdżycy leży nadprodukcja wolnych rodników (zaburzenie funkcji mitochondriów), wywołanie deformacji białek komórki i jej odpowiedź w mechanizmie stresu siateczki endoplazmatycznej (ang. *unfolded protein response – endoplasmic reticulum stress*, UPR-RE) [38]. Wolne rodniki tlenowe nie tylko powodują modyfikację cząsteczek lipoprotein, promując powstawanie zmodyfikowanych, tzw. oksydowanych LDL (ox-LDL) w krwi, lecz wewnątrzkomórkowo również uszkadzają DNA i białka komórkowe, upośledzając funkcję i regenerację komórek [38, 39].

Badania kliniczne i eksperymentalne wykazały istotnie różny poziom metylacji genomowego DNA u pacjentów z chorobami układu krążenia (CHD) w porównaniu ze zdrową populacją [40]. Zasadniczym elementem zagrożenia np. ze strony podwyższonego stężenia homocysteiny w etiopatogenezie rozwoju miażdżycy jest jej oddziaływanie na komórki śródbłonka [38]. Stwierdzono, że homocysteina hamuje regenerację komórek śródbłonka przez



**Rycina 4.** Rola metylacji w procesie transformacji nowotworowej



zahamowanie metylacji białka p21 ras, należącego do rodziny białek RAS związanych z przekazem sygnału wewnątrzkomórkowego odpowiedzialnego za wzrost, różnicowanie i przeżycie komórek [41]. Spadek ekspresji genu kodującego p21 ras powoduje zmniejszenie syntezy komórkowego DNA, co ogranicza wzrost komórek i odbudowę uszkodzonej ściany naczynia [41].

Oprócz upośledzonej funkcji komórek endotelialnych, w przebiegu chorób sercowo-naczyniowych stwierdzono patologiczny rozrost komórek mięśni gładkich naczyń (VSMC) – remodelling naczyniowy, prowadzący do usztywnienia ścian naczyń, np. podczas rozwoju powikłań w przebiegu nadciśnienia tętniczego [42]. Wykazano, że homocysteina oprócz oddziaływania na komórki śródbłonna może indukować przerost VSMC poprzez zwiększenie ekspresji genów cyklin A i D1 [43]. Badania nad nasiloną proliferacją mięśni gładkich naczyń potwierdziły rolę metylacji DNA jako istotnego czynnika regulacyjnego w rozwoju blaszek miażdżycowych [44]. Analiza materiału genetycznego wyizolowanego z blaszek miażdżycowych zarówno u ludzi, jak i w modelu zwierzęcym (myszy i króliki) wykazała, że w procesie aterosklerozy hipometylacja genomowego DNA koreluje z nasileniem aktywności transkrypcyjnej genów [44].

### Kardiomiopatia przerostowa

Kardiomiopatia przerostowa (ang. *hypertrophic cardiomyopathy*, HCM) to pierwotny, genetycznie uwarunkowany przerost mięśnia serca (wzrost masy mięśniowej komór bez zwiększenia wymiarów ich jam), który anatomicznie najczęściej charakteryzuje się asymetrycznym przerostem przegrody, jednak w 10–15% może objawiać się jako typowy przerost koncentryczny [45]. Znane są formy rodzinne występującej kardiomiopatii będącej cechą autosomalną związaną z występowaniem mutacji wielu genów, między innymi z mutacją w genie ciężkiej miozyny sercowej (głównie beta-miozyny) *MHCβ*, białka C wiążącego miozynę, ciężkiego łańcucha alfa-miozyny czy troponiny T [45, 46]. Dalsze obserwacje wykazały u pacjentów z HCM nie tylko mutacje w obrębie genu MHC, ale również zwiększoną jego ekspresję w kardiomiocytach [47]. Badania kliniczne u pacjentów z HCM potwierdziły rolę metylacji DNA w regulacji ekspresji genu *MHCβ* [48]. Co ciekawe, u badanych osób zaobserwowano istnienie specyficznego tkankowo profilu metylacji DNA. W leukocytach krwi obwodowej pacjentów z HCM stwierdzono hipermetylację regionu promotorowego genu *MHCβ* oraz prawie całkowite zahamowanie jego ekspresji. Równocześnie w kardiomiocytach hipometylacja tych regionów wiązała się z istotnym nasileniem ekspresji genu *MHCβ* [48].

### Podsumowanie

Coraz lepsze rozumienie mechanizmów epigenetycznych odgrywających rolę w rozwoju schorzeń cywilizacyjnych (nowotwory, choroby układu krążenia) otwiera nowe

możliwości terapeutyczne. Wiele genów supresorowych (hamujących proliferację komórek) nowotworów ulega wyciszeniu na drodze hipermetylacji DNA [49]. Podjęto próby reaktywacji wyciszonych genów poprzez zahamowanie działania metylotransferaz DNMT, głównie DNMT1 [49]. Analog nukleotydów: decytabina (5-aza-2'-deoksycytidyna), hamuje działanie DNMT poprzez kowalencyjne przyłączenie ich do nici DNA i inicjację degradacji tych enzymów przy udziale proteosomów [49, 50]. Badania *in vitro* wykazały zahamowanie proliferacji i wzrostu komórek nowotworowych po podaniu decytabiny, nie stwierdzono natomiast aktywacji ich różnicowania [49]. Trwają badania nad odkrywaniem coraz to nowych i lepszych przedstawicieli analogów nukleotydów cytozyny [50]. Należy jednak pamiętać, że istotnym ograniczeniem ich przydatności jest konieczność wbudowania decytabiny do nici DNA, aby aktywować ten związek, co może być związane z ryzykiem powstania nowych mutacji i zmiany właściwości komórek potomnych [49]. Dodatkowo wykazano, że decytabina jest toksyczna dla szpiku kostnego (tkanka o bardzo wysokiej aktywności mitotycznej), co stanowi dodatkowe ograniczenie przydatności tego związku w terapii [49, 50]. Pomimo to prowadzone są badania nad możliwością wykorzystania w praktyce klinicznej analogów cytozyny w terapii, głównie przeciwnowotworowej, ale także w kardiomiopatii przerostowej. Nadal jednak nie udowodniono, że zahamowanie samej DNMT1 jest wystarczającym działaniem reaktywującym geny supresorowe wyciszone poprzez metylację DNA [51].

### Piśmiennictwo

1. Sieberts SK, Schadt EE. Moving toward a system genetics view of disease. *Mamm Genome* 2007; 18: 389-401.
2. Gill-Carey O, Hattersley AT. Genetics and type 2 diabetes in youth. *Pediatr Diabetes* 2007; 8: 42-7.
3. Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Molecular genetics of atherosclerosis. *Hum Genet* 2009; 125: 467-91.
4. Maeda S. Genetics of diabetic nephropathy. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 2008; 2: 363-71.
5. Shibata S, Wutz A. Transcript versus transcription? *Epigenetics* 2008; 3: 246-9.
6. Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 192-206.
7. Dvash T, Fan G. Epigenetic regulation of X-inactivation in human embryonic stem cells. *Epigenetics* 2009; 4: 19-22.
8. Weil C, Martienssen R. Epigenetic interactions between transposons and genes: lessons from plants. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 188-92.
9. Sevini F, Santoro A, Raule N, et al. Role of mitochondrial DNA in longevity, aging and age-related diseases in humans: a reappraisal. *Ital J Biochem* 2007; 56: 243-53.
10. Abbas A, Gupta S. The role of histone deacetylases in prostate cancer. *Epigenetics* 2008; 3: 300-9.
11. Mueller WC, von Deimling A. Gene regulation by methylation. *Recent Results Cancer Res* 2009; 171: 217-39.
12. Rando OJ, Ahmad K. Rules and regulation in the primary structure of chromatin. *Curr Opin Cell Biol* 2007; 19: 250-6.

13. Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, et al. How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14: 1025-40.
14. Blumenberg M, Gao S, Dickman K, et al. Chromatin structure regulation in transforming growth factor-beta-directed epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 162-74.
15. Shukla A, Chaurasia P, Bhaumik SR. Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 1419-33.
16. Bártová E, Krejci J, Harnicarová A, et al. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem* 2008; 56: 711-21.
17. Brosch G, Loidl P, Graessle S. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 409-39.
18. Griffiths EA, Gore SD. DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 2008; 45: 23-30.
19. Boussouar F, Rousseaux S, Khochbin S. A new insight into male genome reprogramming by histone variants and histone code. *Cell Cycle* 2008; 7: 3499-502.
20. Sulewska A, Niklinska W, Kozłowski M, et al. DNA methylation in states of cell physiology and pathology. *Folia Histochem Cytobiol* 2007; 45: 149-58.
21. Kieć-Wilk B, Polus A, Mikołajczyk M, Mathers JC. Beta-carotene and arachidonic acid induced DNA methylation and the regulation of pro-chemotactic activity of endothelial cells and its progenitors. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 757-66.
22. Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008; 16: 341-50.
23. Illingworth RS, Bird AP. CpG islands – 'a rough guide'. *FEBS Lett* 2009; 583: 1713-20.
24. Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mutat Res* 2008; 647: 30-8.
25. Yuan Y, Liu H, Sahin A, Dai JL. Reactivation of SYK expression by inhibition of DNA methylation suppresses breast cancer cell invasiveness. *Int J Cancer* 2005; 113: 654-9.
26. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, et al. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395: 89-93.
27. Lin HH, Ke HL, Huang SP, et al. Increase sensitivity in detecting superficial, low grade bladder cancer by combination analysis of hypermethylation of E-cadherin, p16, p14, RASSF1A genes in urine. *Urol Oncol* 2009 Jan 30. [Epub ahead of print].
28. Fujiwara S, Noguchi T, Takeno S, et al. Hypermethylation of p16 gene promoter correlates with loss of p16 expression that results in poorer prognosis in esophageal squamous cell carcinomas. *Dis Esophagus* 2008; 21: 125-31.
29. Buysschaert I, Schmidt T, Roncal C, et al. Genetics, epigenetics and pharmaco-(epi)genomics in angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2533-51.
30. Nishida N, Yano H, Nishida T, et al. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2: 213-9.
31. Schoettler N, Brahn E. Angiogenesis inhibitors for the treatment of chronic autoimmune inflammatory arthritis. *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 425-33.
32. Crawford TN, Alfaro DV 3rd, Kerrison JB, Jablon EP. Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5: 8-13.
33. Ahmed Z, Bicknell R. Angiogenic signalling pathways. *Methods Mol Biol* 2009; 467: 3-24.
34. Roy S, Khanna S, Sen CK. Redox regulation of the VEGF signaling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercise and cutaneous wound healing. *Free Radic Biol Med* 2008; 44: 180-92.
35. Naik TU, Naik MU, Naik UP. Junctional adhesion molecules in angiogenesis. *Front Biosci* 2008; 13: 258-62.
36. Kieć-Wilk B, Polus A, Grzybowska J, et al. beta-Carotene stimulates chemotaxis of human endothelial progenitor cells. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 488-98.
37. Johnson IT, Belshaw NJ. Environment, diet and CpG island methylation: epigenetic signals in gastrointestinal neoplasia. *Food Chem Toxicol* 2008; 46: 1346-59.
38. Cottone S, Lorito MC, Riccobene R, et al. Oxidative stress, inflammation and cardiovascular disease in chronic renal failure. *J Nephrol* 2008; 21: 175-9.
39. Virani SS, Polsani VR, Nambi V. Novel markers of inflammation in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2008; 10: 164-70.
40. Sharma P, Kumar J, Garg G, et al. Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients. *DNA Cell Biol* 2008; 27: 357-65.
41. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, et al. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000; 275: 29318-23.
42. Wang J, Qiao J, Zhao LH, et al. Proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in the development of ascites syndrome in broilers induced by low ambient temperature. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007; 54: 564-70.
43. Yideng J, Jianzhong Z, Ying H, et al. Homocysteine-mediated expression of SAHH, DNMTs, MBD2, and DNA hypomethylation potential pathogenic mechanism in VSMCs. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 603-11.
44. Hiltunen MO, Turunen MP, Häkkinen TP, et al. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med* 2002; 7: 5-11.
45. Maron BJ. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *JAMA* 2002; 287: 1308-20.
46. Maron BJ, Casey S, Hauser RG, Aeppli DM. Clinical course of hypertrophic cardiomyopathy with survival to advanced age. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 882-8.
47. Kunisada K, Negoro S, Tone E, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 315-9.
48. Clifford CP, Nunez DJ. Human beta-myosin heavy chain mRNA prevalence is inversely related to the degree of methylation of regulatory elements. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 736-43.
49. Yu N, Wang M. Anticancer drug discovery targeting DNA hypermethylation. *Curr Med Chem* 2008; 15: 1350-75.
50. Datta J, Ghoshal K, Denny WA, et al. A new class of quinoline-based DNA hypomethylating agents reactivates tumor suppressor genes by blocking DNA methyltransferase 1 activity and inducing its degradation. *Cancer Res* 2009; 69: 4277-85.
51. Flotho C, Claus R, Batz C, et al. The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2009; 23: 1019-28.